Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Granulozytenfunktionen bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom unter AVC-Therapie

Untersuchung von Chemotaxis und Migration

INAUGURAL — DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARKUS KARUTZ
aus Trossingen

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0134

Aus der Abteilung Innere Medizin II
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H. D. Waller
der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen

Granulozytenfunktionen bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom unter AVC-Therapie

Untersuchung von Chemotaxis und Migration

INAUGURAL — DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
MARKUS KARUTZ
aus Trossingen

1983

Dekan:	Professor Dr. W. Frommhold
1. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Chr. Benöhr
2. Berichterstatter:	Professor Dr. D. Niethammer

gedruckt bei H.- J. Köhler · Reprografischer Betrieb · Tübingen

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL, METHODEN UND AUSWAHL DER PATIENTEN	6
2.1.	Patientenkollektive	6
2.2.	Normkollektive	7
2.3.	Therapie	7
2.4.	Beschreibung der Untersuchungsmethoden	7
2.4.1.	Migration nach Boyden	9
2.4.2.	Migration unter Agarose	10
2.4.3.	Statistische Auswertung	13
2.4.4.	Anhang	13
3.	ERGEBNISSE	16
3.1.	Migration mit der Boydenkammer	16
3.2.	Migration mit dem Nelson-Test	16
4.	DISKUSSION	25
4.1.	Morphologische, physiologische und biochemische Grundlagen	25
4.2.	Krankheiten mit verminderter Chemotaxis und Migration	28
4.3.	Überblick über die gebräuchlichen Methoden	30
4.4.	Begründung für die Wahl unserer Methode	33
4.5.	Zytostatische Therapie	35
4.5.1.	Wirkungsmechanismus, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen der verwendeten Zytostatika	36
4.6.	Diskussion der Ergebnisse	41
5.	ZUSAMMENFASSUNG	46
6.	LITERATUR	48

UNIV. LEIDEN BIBL.

1. EINLEITUNG

Seit langem ist bekannt, daß die Granulozyten neben den Monozyten eine wesentliche Rolle bei der Infektionsabwehr spielen: Granulozytopenien oder Krankheiten, die mit einer funktionellen Insuffizienz der Granulozyten einhergehen, zeigen deutlich die Abhängigkeit des menschlichen Organismus von diesem Zellsystem gegenüber exogenen Noxen.

Die Funktionen der im peripheren Blut befindlichen Granulozyten lassen sich zeitlich in vier Einzelschritten erfassen:

a) der zirkulierende Granulozyt haftet sich durch äußere Einflüsse physikalischer und chemischer Natur an das Gefäßendothel an (Adhäsion).

b) Er wandert aus dem Gefäß ins Gewebe, aus dem eine Rückwanderung ins Gefäßsystem nicht mehr möglich ist. Dieser Teilschritt ist eine komplexe Funktion aus spontaner Migration und gerichteter, aktiver Bewegung auf die Quelle einer chemotaktisch aktiven Substanz zu (Migration/Chemotaxis).

c) In Zusammenwirkung mit Faktoren des Komplementsystems, verschiedenen bakteriziden Substanzen und spezifischen Antikörpern kommt es zu Ingestion des Erregers (Phagozytose).

d) Schließlich wird dieser intrazellulär abgetötet (Killing).

Für die Beurteilung dieser Einzelmessungen wurde eine Vielzahl von Testmethoden erarbeitet (64).

In zahlreichen Publikationen der letzten Jahre wurden Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit der Frage nach der Beeinflussung der Leukozytenfunktionen bei Tumoren beschäftigen.

Als Testsystem diente zunächst der heute wegen seiner Ungenauigkeit umstrittene NBT-Test (SIEGERT, R. et al., 55). Später wurden aber auch Defekte von Einzelfunktionen wie Phagozytose und Killing bei soliden Tumoren, auch in einzelnen Fällen bei malignen Lymphomen publiziert.

Bei verschiedenen Neoplasien wurden von McRIPLEY, R. J. et al. (44) defekte Phagozytose und Abtötung beschrieben. HAIM, N. et al. (31, 32) und LEHRER et al. (37) fanden mit Hilfe des NBT-Tests Killing-Defekte bei Patienten mit soliden sowie ausgeheilten Tumoren. LEHRER et al. (37) fand eine normale Phagozytose bei soliden Tumoren. Für M. Hodgkin wurde eine normale Granulozytenfunktion beschrieben (STEIGBIGEL et al., 58), bei akuten Leukosen des Kindesalters bestand hingegen eine Korrelation zum Krankheitsstadium (STRAUSS et al., 60). Eine Herabsetzung der Chemotaxis von Monozyten zeigte die (in ihrer Aussagefähigkeit sehr einzuschränkende) Arbeit von SNYDERMAN und PIKE (57).

Die biochemischen und klinischen Ergebnisse der Onkologie sowie statistische Grundprinzipien gestatten es nicht, verschiedene Tumoren als gleichartig zu behandeln. So wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, ein einheitliches Krankheitsbild in Form des metastasierenden Mamma-Carcinoms hinsichtlich der Granulozytenfunktionen zu untersuchen.

Die heute im Zusammenhang mit Malignomen zunehmend durchgeführte Therapie mit Zytostatika führt bei zahlreichen Substanzgruppen zu Knochenmarksschädigung, nachfolgender Granulozytopenie und verminderter Infektabwehr.

Eine der häufig verwendeten Substanzen ist Adriamycin, ein Anthrazyclinantibiotikum. Adriamycin führt zur Schädigung zahlreicher Gewebe, wie Knochenmark, Haarfollikel, Schleimhäute des Gastrointestinaltrakts, Herzmuskel und damit zu Nebenwirkungen wie Granulozytopenie, Haarausfall, Übelkeit, Herzrythmusstörungen. Diese Effekte entwickeln sich meist erst 1-2 Wochen nach Medikamentengaben. Adriamycin ist aber infolge seiner chemischen Natur zur chemischen Radikalbildung in der Lage und vermag bei in vitro-Versuchen mit Zellsuspensionen oder isolierten Organen wie der perfundierten Leber erhebliche Stoffwechselveränderungen zu induzieren. Experimentelle Erfahrungen wurden bereits an Hand des Gluthathinostoffwechsels der Leber und der Erythrozyten gewonnen; besondere Empfindlichkeit zeigen Zellmembranen, beispielsweise der Leber und der Thrombozyten, die bei Inkubation mit Adriamycin eine erhebliche Lipidperoxidation aufweisen (46, 61).

Uns interessierte bei der vorliegenden Untersuchung, ob menschliche Granulozyten im peripheren Blut nach Injektion von Adriamycin Veränderungen ihrer Funktionsleistungen zeigen, wann dieser Früheffekt (im Gegensatz zu dem Späteffekt auf das Knochenmark) auftritt, auf welche der verschiedenen Funktionen er sich auswirkt und ob er reversibel ist.

Voruntersuchungen deuteten darauf hin, daß ein Effekt der zytostatischen Therapie auf granulozytäre Funktionen bereits nach wenigen Stunden zu beobachten ist. Deshalb wurden die Patientenkollektive so eingeteilt, daß vor allem die ersten beiden Tage genau erfaßt werden konnten.

Wiederholte Blutentnahmen für Longitudinalstudien zur Abschätzung der intraindividuellen Veränderung ließ das Allgemeinbefinden der Patientinnen nicht zu.

Die Untersuchungen wurden an Patientinnen der Medizinischen Unviversitätsklinik Tübingen durchgeführt, die wegen eines metastasierenden Mamma-Carcinoms zytistatisch mit Adriamycin, Vincristin und Cyclophosphamid (AVC-Schema) behandelt wurden.

Die vorliegende Arbeit ist Teil einer Untersuchung, die zwei Fragen bearbeitet:

a) lassen sich Einflüsse des metastasierenden Mamma-Carcinoms auf die Granulozytenfunktionen Adhäsion, Chemotaxis/Migration, Phagozytose und intrazelluläre Abtötung zeigen.

b) wird unter der in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen üblichen AVC-Therapie mit Adriamycin, Vincristin, Cyclophosphamid eine dieser Funktionen beeinträchtigt und ist der Effekt reversibel?

Die experimentellen Untersuchungen wurden gemeinsam mit R. Knapp erarbeitet, die die Teilergebnisse Adhäsion Phagozytose, NBT-Test veröffentlicht hat. Die vorliegende Arbeit enthält die Resultate der Untersuchungen über

Chemotaxis und Migration.

Die Patientenkollektive beider Arbeiten sowie die untersuchten Blutproben sind identisch.

2. MATERIAL, METHODEN UND AUSWAHL DER PATIENTEN

2.1. Patientenkollektive

Insgesamt wurden 43 Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Carcinom im Alter zwischen 37 und 75 Jahren untersucht. Entsprechend der zytostatischen Vorbehandlung wurden 4 verschiedene Gruppen gebildet.

In der ersten Gruppe (vT) wurden 17 Patienten untersucht, die bisher keine Zytostatika erhalten hatten, oder bei denen der letzte Zytostatika-Stoß mindestens 4 Wochen zurücklag.

Die zweite Gruppe (1T) bestand aus 12 Patienten, bei denen jeweils einen Tag vor der Blutentnahme Adriamycin und Vincristin, jeweils i.v., injiziert worden waren.

Gruppe drei (2 T) bestand aus 5 Patientinnen, bei denen die Untersuchungen zwei Tage nach Therapiebeginn durchgeführt wurden.

Die vierte Gruppe (3-15 T) faßte alle Patientinnen zusammen, bei denen der Beginn des jeweiligen Zytostatikastoßes mindestens drei und höchstens 15 Tage zurücklag. Diese Gruppe bestand aus 9 Patientinnen.

Bei zwei Patientinnen waren die Präparate nicht auswertbar.

Eine Unterteilung nach Ovarektomie, Lebensalter, Vorbehandlung mit Tamoxifen und Ausmaß der Metastasierung wurde nicht vorgenommen.

2.2. Normkollektive

Zum Vergleich zu den Patientenkollektiven wurden zwei Gruppen von Probanden gebildet.

Die erste Normgruppe (1NG) bestand aus jeweils 10 gesunden Männern und Frauen im Alter zwischen 20 und 30 Jahren.

Die zweite Normgruppe bestand aus 20 weiblichen Probanden im Alter zwischen 35 und 70 Jahren, die nicht an Stoffwechselstörungen, Entzündungen oder malignen Erkrankungen litten. Es wurden beide Gruppen gebildet, um Alters- und Geschlechtsunterschiede auszuschließen.

2.3. Therapie

Bei allen untersuchten Patientinnen mit Mamma-Carcinom kam das AVC-Schema zur Anwendung (66, 67), das nach folgendem Plan verabreicht wurde:

Adriblastin 40 mg/m^2 i.v. Tag 1
Vincristin 1 mg/m^2 i.v. Tag 1
Endoxan 200 mg/m^2 p.o. Tag 3-6

Dieser Zyklus wurde alle 4 Wochen wiederholt.

2.4. Beschreibung der Untersuchungsmethoden

Blutmenge:

Jedem Probanden wurden 20 ml Citratblut (3 ml Citrat + 17 ml Blut) in Plastik-Einmalspritzen venös entnommen

und sofort nach Entnahme verarbeitet. Diese Menge reichte aus, die in der vorliegenden Arbeit sowie die von R. Knapp beschriebenen Tests durchzuführen.

Herstellung der Granulozytensuspension:

Das Zitratblut wurde im Verhältnis 1:1 mit 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt. In graduierten Röhrchen wurden jeweils 8 ml Blut-Kochsalzgemisch über 3 ml Lymphopräp (Nyegaard & Co., Norwegen) unter Verwendung einer 10 ml Plastikspritze und einer 1,6 Storz-Kanüle überschichtet. Dabei mußte beachtet werden, daß an der Grenzschicht zwischen Blut und Lymphopräp beim Überschichten keine Wellen entstehen und sich die beiden Flüssigkeiten nicht durchdringen.

Nach exaktem Auswiegen der Röhrchen wurde in einer freischwingenden Hettichzentrifuge 20 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

Mit einer Wasserstrahlpumpe wurde der Überstand abgesaugt und die unterste, rote Schicht, in der die Granulozyten mit enthalten waren, mit dem Nährmedium RPMI aufgeschüttelt. Durch dieses Überschichten mit Lymphopräp und die anschliessende Zentrifugation wurden Lymphozyten und Monozyten von den Granulozyten getrennt, die jetzt nur noch mit den Erythrozyten gemischt waren. Die Suspension wurde in einer Silenta Zentrifuge 10 Min. bei 1500 U/Min. zentrifugiert und der Überstand wieder abgesaugt. Das verbliebene Granulozyten-Erythrozytengemisch wurde wieder im Verhältnis 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und jeweils 10 ml über 20 ml Ronpacon-Dextranlösung (Herstellung siehe Anhang) mit einer exakten Dichte von 1085, überschichtet. Nach ca. 1 h haben sich die Erythrozyten abgesetzt. Die oberste, schwach rötliche Schicht, in der sich die Granulozyten befanden, wurde mittels einer Pasteurpipette abgehebert und erneut mit RPMI aufge-

schwemmt. Nach Zentrifugation bei 3000 U/Min. wurde der Überstand abgekippt. Das Sediment wurde mit RPMI auf ein Volumen von 1,2 ml verdünnt und die Zellzahl der Suspension bestimmt. Die Suspension wurde auf eine Konzentration von etwa 12,5 x 10^6 Zellen/ml eingestellt.

2.4.1. Migration nach Boyden

Dieser Test dient der Beurteilung des Migrations/Chemotaxis-Komplexes von Leukozyten unter dem Einfluß eines Zymosanaktivierten Serums. Wir verwendeten die Methode von CATES, RAY und QUIE (11) und ließen die Kammern nach deren Angaben in der Universitätswerkstatt herstellen. Wir benützten Zellulosenitratfilter mit 3 µ Porenweite (Millipore S. A., France).

Herstellung des chemotaktischen Faktors:

1 mg Zymosan (s. Anhang) wurde in 0,1 ml NaCl gelöst mit 1 ml ABO-Serum gemischt, anschließend eine Stunde bei 37°C zur Inaktivierung des Serums inkubiert. Dann wurden 0,27 ml des inkubierten Ansatzes mit 24 ml RPMI (Gibco Europe, Schottland) gemischt. Pro Patient wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, für die jweils 0,4 ml Zellsuspension gebraucht wurden. Es mußte darauf geachtet werden, daß beim Verschließen der Kammer der Filter nicht beschädigt wurde. Nun wurde in die untere Kammer der chemotaktische Faktor eingefüllt unter Vermeidung von Luftblasen, die den Kontakt zwischen Filter und Flüssigkeit verhindern könnten. Nach Einfüllen der Suspension in die obere Kammer wurde bei 37°C 90 Min. inkubiert. Die Zellsuspension wurde abgesaugt und der Filter herausgenommen, in die Spezial-Färbebank eingelegt und nach folgender Methode gefärbt:

Alkohol 99 % 15 Sek.
Mayers Hematoxylin 6 Min.
Spülen in aqua dest.
HCl-Alkohol 1 Min.
Bluing agent 1 Min.
Abspülen in aqua dest.
Alkohol 70 % 1 Min.
Alkohol 96 % 1 Min.
Alkohol 100 % 1 Min.
Xylol 10 Min.

Die Filter wurden mit der oberen Seite nach unten auf einen Objektträger gelegt und mit Eukitt (O. KINDLER, Freiburg i. Br.) luftblasenfrei eingedeckt.

Auswertung:

Mit einem 100er-Ölimmersionsobjektiv wurden 20 Blickfelder ausgezählt. Dabei war darauf zu achten, daß nur die oberste Zellschicht berücksichtigt wurde und die Felder zufällig verteilt waren. Um vergleichbare Aussagen zu erhalten, rechneten wir die in 20 Blickfeldern ausgezählten Zellen auf eine Normkonzentration von 10×10^6 Zellen/ml um.

2.4.2. Migration unter Agarose

Vorbereitung: Herstellung von Agaroseböden:

2,4 g Agar purum (Behring AG, Marburg) wurden in 100 ml aqua dest. gelöst und solange unter Rühren erhitzt, bis die Lösung klar war. In der Zwischenzeit wurden in einem Becherglas 20 ml RPMI + 20 ml ABO-Serum (Seromed, München) + 2 ml 10 % Natriumbikarbonat (Difco Lab., Detroit) +

58 ml aqua dest. + 12 mg Penicillin G Na/K (Hoechst AG, Frankfurt) + 30 mg Streptomycin (Streptothenat, Grünenthal, Stolberg) angesetzt. Nach Abkühlen der Agarlösung auf ca. 60°C wurde die eben beschriebene Mischung hinzugegeben und das ganze Gemisch in Petrischalen gegossen, so daß der Boden etwa 3 mm hoch bedeckt wurde. Auf diese Weise reichte die Menge für 11 Petrischalen, die mit der Unterseite nach oben im Kühlschrank aufbewahrt wurden.

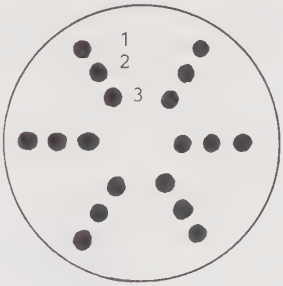

Abb. 1

Durchführung:

Mittels einer dafür angefertigten Schablone und einer Stanzkanüle wurden nach Abb. 1 jeweils 6 Dreier-Gruppen von senkrechten Löchern gestanzt. Der Durchmesser sowie der Abstand der Löcher betrug jeweils 2,5 mm. Beim Stanzen war darauf zu achten, daß der Agar nicht von der Unterfläche abgelöst und die Plastikschale nicht durch die Stanzkanüle geschädigt wurde, so daß also keine Rillen entstanden.

In die Löcher wurden entsprechend (Abb. 1) jeweils 10 µl Flüssigkeit eingefüllt:

Loch 1: Nullwert (RPMI)
Loch 2: Zellsuspension
Loch 3: Chemotaktischer Faktor (1 mg Zymosan gelöst in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung verdünnt mit 1 ml RPMI).

Die zugedeckten Petrischalen wurden in einem speziell dafür vorgesehenen, luftdicht abgeschlossenen Behälter 18 h bei 37°C inkubiert, wobei mittels drei Packungen Gas-pack

(BBL Microbiology Systems, USA) ein 5%iges CO_2-Milieu hergestellt wurde. Nach dem Inkubieren wurden die Schalen mit 100%igem Methanol 30 Min., anschließend mit 4%igem Formalin 30 Min. fixiert und der Agar entfernt. Nach Pappenheimfärbung wurden die Felder mit einem Projektor (Kaiser VC 60) auf das 10fache vergrößert und aufgezeichnet.

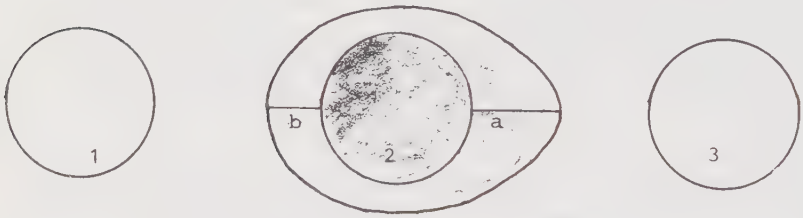

Abb. 2

Auswertung:

Bei sachgemäß durchgeführtem Versuch ergab sich ein Bild wie in Abb. 2. Gemessen wurden die Strecken a und b und sowohl der Quotient als auch die Differenz errechnet. Die mittlere chemotaktische Differenz ergab sich als Mittelwert der Einzeldifferenzen, ebenso der mittlere chemotaktische Faktor als Mittelwert der einzelnen Quotienten. Beide Werte wurden zur Bewertung gesondert betrachtet.

2.4.3. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Migrationstests nach Boyden und unter Agarose wurden jeweils einem multiplen t-Test und dem Einzelvergleichstest nach Bonferoni unterworfen. p wurde hierbei mit 0,05 gewählt. Für die freundliche Betreuung bei der statistischen Auswertung sind wir Prof. Dr. K. Dietz, Direktor des Instituts für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen, zu Dank verpflichtet.

2.4.4. Anhang

Agar purum: ORDP 19603585, Behringwerke AG, Marburg, Germany

Bicarbonat: Bicarbonate solution 10 %, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA

Bluing agent: $MgSO_4$ 20 g, $NaHCO_3$ 2 g

Dextran: 5 Amp. Sodium Metrizoate à 20 ml + 128,65 ml aqua dest. + Dextran 20,10 g + 335 ml a. d.
Sodium Metrizoate: Metrizoate Solution 75 % w/v; Packung zu 5 x 20 ml; Nyegaard & Co A/S Oslo, Norway. Density: 1,46 g/ml ($20^{\circ}C$).
Dextran: Dextran T 500; Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden

Eukitt: Mounting medium for the microscopic preparations, O. Kindler, Freiburg i. Br., W. Germany

Filter für Boydenkammer: Filter Type SS, pore size 3,0 µm, Cat. No. SSWP 01300; Millipore, S. A., 67120 Molsheim, France

Gas Pak: CO_2 Systems; BBL Microbiology Systems, Division of Becton Dickinson and Company, B. D., Cockeysville, MD 21040 USA. Disposable Carbon Dioxids Generator Envelopes for use with the Gas Pak Systems, Nr. 70308

Lymphopräp: Density 1,077 g/ml (Mischung aus: Sodium Metrizoate + Ficoll, density 1077 + 0,001 g/ml); Nyegaard & Co. A/S, Oslo, Norway

Mayers Hämalaunlösung: Merck Nr. 9249

May-Grünwalds Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung, enthält Methanol), Art. Nr. 1424

Methanol: 100 %

Penicillin: Penicillin G NA/K Salz: Pen.G - Na 9623000 IE
Pen.G - K 377000 IE
Hoechst AG, Frankfurt a. M., Germany

Projektor: Kaiser VC 60, Vergrößerung 10 x

RPMI 1640 (IX) with L'Glutamine, Cat. No. 1876, Batch No. K 900103, Gibco Europe, Glasgow, Scotland

Serum: ABO-Serum, Seromed, München, Germany

Streptothenat: entspricht 1,0 g Streptomycin Base, 1,0 g Streptomycin sulfat, 0,426 g Streptomycin panthothenat. Chemie Grünenthal GmbH, Stolberg im Rheintal

Thrombogenz Plaxan, Biotechnik GmbH, 2000 Hamburg 65

Zentrifugen: Silenta Roto, Type 500 A
Hettich Rotixa, Bj. 1971

Zymosan: Zymosan A., No. Z-4250 from S. Cervisiae yeast, Sigma chemical Comp.
Ansatz: 0,1 ml 0,9% NaCl + 1 mg Zymosan + 1 ml ABO-Serum

3. ERGEBNISSE

3.1. Migration mit der Boydenkammer

Bei der Untersuchung von Migration/Chemotaxis ergaben sich im Test mit der Boydenkammer für die Gruppe 1NG ein Mittelwert von 107.03 $\pm$ 22.16 und für die Gruppe 2NG ein Mittelwert von 86.86 $\pm$ 17.4 (s. Tab. 1). Während das Patientenkollektiv vor Therapiebeginn (vT) mit einem Wert von 82.42 ($\pm$ 28.98) im Einzelvergleich nach Bonferoni ($p = 0.05$) einen signifikanten Unterschied zum Normalkollektiv 1NG zeigte, waren die Werte mit dem Vergleichskollektiv 2NG nahezu identisch (s. Tab. 1 u. 2). An den ersten beiden Tagen nach Therapiebeginn fiel die Migration mit 56.48 ($\pm$ 13.63) bzw. 50.4 ($\pm$ 7.04) deutlich und gegenüber beiden Normgruppen signifikant ab (s. Tab. 1 u. 2). Dann stieg die Migration in den nächsten Tagen wieder an, erreichte jedoch nicht den Ausgangswert.

3.2. Migration mit dem Nelson-Test

Wir haben den Test sowohl nach dem chemotaktischen Faktor (s. Tab. 3 und 4) als auch nach der chemotaktischen Differenz ausgewertet.
Da bei der Auswertung nach der Differenz im multiplen t-Test ($p = 0.05$) keine Signifikanz nachgewiesen werden konnte, wurde der Einzelvergleich nach Bonferoni nicht durchgeführt.
Aber auch bei Analyse des chemotaktischen Faktors konnte eine signifikante Differenz nur zwischen der ersten Normgruppe und 1T gezeigt werden.
Die Ergebnisse zeigen, daß die Empfindlichkeit des Agarosetests wahrscheinlich geringer ist als die des Tests mit der Boydenkammer.

Tabelle 1: Ergebnisse beim Migrationstest mit der Boyden-kammer

Nr.	1. NG	2. NG	vT	1T	2T	3-15T
1	130.5	75.7	79.5	80	61.7	108
2	144	77.7	145	73	52.2	48.5
3	115	83.3	49	55	43.8	56
4	102.5	75	98.7	70	48.3	117
5	82.8	67	86.8	45	46	54
6	149	75	119	57.8		67
7	102	81.3	97.3	51		103
8	105	134	69.2	48.3		67.2
9	96	75	35.7	38.4		37.7
10	80.6	97.2	92.8	46.3		
11	142.2	98	70.7			
12	81.5	76.7	65.4			
13	79.7	109	71.7			
14	88	79.5	56.5			
15	104	82	131			
16	104.9	72	67.3			
17	101.8	86.8	65.6			
18		86.2				
19		119				
Σ	1819.5	1650.4	1401.2	564.8	252	658.4
$\bar{x}$	107.03	86.86	82.42	56.48	50.4	73.16
s	22.16	17.40	28.98	13.63	7.04	28.78
n	17	19	17	10	5	9

Tabelle 2: Auswertung des Migrationstests mit der Boydenkammer im Einzelvergleich nach Bonferoni

verglichene Gruppen	krit. Differenz	emp. Differenz	Signifikanz
1NG - 2NG	22.8	20.17	
1NG - vT	23.42	24.61	+
1NG - 3-15T	28.15	33.87	+
1NG - 1T	27.22	50.55	+
1NG - 2T	34.74	56.63	+
2NG - vT	22.8	4.44	
2NG - 3-15T	27.63	13.7	
2NG - 1T	26.68	30.38	+
2NG - 2T	34.32	36.46	+
vT - 3-15T	28.15	9.26	
vT - 1T	27.22	25.94	
vT - 2T	34.74	32.02	
3-15T - 1T	31.38	16.68	
3-15T - 2T	38.09	22.76	
1T - 2T	37.4	6.06	

t x s = 68.29 (t = Prüfgröße, s = Standardabweichung)

$$\text{krit. Differenz} = t \times s \times \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}$$

Tabelle 3: Ergebnisse des Migrationstests nach Nelson. Auswertung nach dem chemotaktischen Faktor.

Nr.	1.NG	2.NG	vT	1T	2T	3-15T
1	3.86	3.92	6	2	2.8	1.8
2	2.93	2.05	5.23	2.8	1.7	1.56
3	3.55	4.11	3.79	2.1	1.7	3.87
4	4	2	3.48	2.3	2.05	2.7
5	4.52	4.63	2.7	2.74		2.92
6	3.72	2.15	2.7	2.4		
7	3.08	3.46	1.9	1.9		
8	2.8	1.7	4.1	2.6		
9	2.4	3.5	2	2		
10	4.1	3.5	2	1.8		
11	4.6	2.75	1.7	1.85		
12	2.87	2				
13	2.55	3.6				
14		3.7				
15		2.3				
16		2.8				
17		2				
18		2.3				
Σ	44.98	52.47	35.6	24.49	8.25	12.85
$\bar{x}$	3.46	2.92	3.24	2.23	2.06	2.57
s	0.74	0.89	1.43	0.36	0.52	0.93
n	13	18	11	11	4	5

Tabelle 4: Migrationstest nach Nelson, Auswertung nach dem chemotaktischen Faktor: Statistische Auswertung im Einzelvergleich nach Bonferoni.

verglichene Gruppen	krit. Diff.	emp. Diff.	Signifikanz
1NG - vT	1.15	0.22	
1NG - 2NG	1.02	0.54	
1NG - 3-15T	1.48	0.89	
1NG - 1T	1.15	1.23	+
1NG - 2T	1.61	1.4	
vT - 2NG	1.08	0.32	
vT - 3-15T	1.52	0.67	
vT - 1T	1.2	1.10	
vT - 2T	1.64	0.17	

t x s = 2.81 (t: Prüfgröße; s: Standardabweichung).

$$\text{krit. Differenz} = t \times s \times \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}$$

Tabelle 5: Ergebnisse des Migrationstests nach Nelson. Auswertung nach der chemotaktischen Differenz.

Nr.	1.NG	2.NG	vT	1T	2T	3-15T
1	1.45	2.26	2.5	0.83	2	0.7
2	1.43	1.4	0.78	1.1	1	0.7
3	1.8	3.93	2.11	0.67	0.9	2.3
4	1.3	1.1	1.4	1.4	1.4	1.65
5	2.77	2.05	1.3	1.85		1.22
6	1.43	1.15	1.5	1.43		
7	2.33	2.13	0.8	1		
8	1.2	0.8	3.68	1		
9	1.7	1.8	1.2	0.7		
10	2.7	2	0.6	0.9		
11	2.7	1.3	0.8	0.8		
12	1.5	1				
13	1.3	2.2				
14		2.2				
15		1.4				
16		2.9				
17		1.15				
18		1.3				
Σ	23.61	32.07	16.67	11.67	5.3	6.57
$\bar{x}$	1.82	1.78	1.52	1.06	1.33	1.31
s	0.59	0.78	0.93	0.36	0.5	0.68
n	13	18	11	11	4	5

Diese Ergebnisse sind im multiplen t-Test (P = 0,05) nicht signifikant. Deshalb wurde der Einzelvergleich nach Bonferoni nicht durchgeführt.

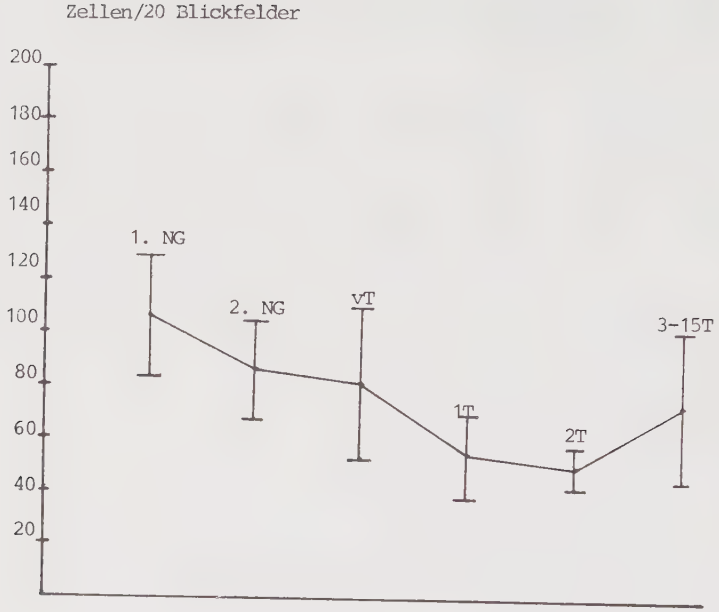

Abb. 3: Chemotaxis/Migration von Granulozyten mit der Boydenkammer bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca vor und nach Injektion von Adriamycin und Vincristin.

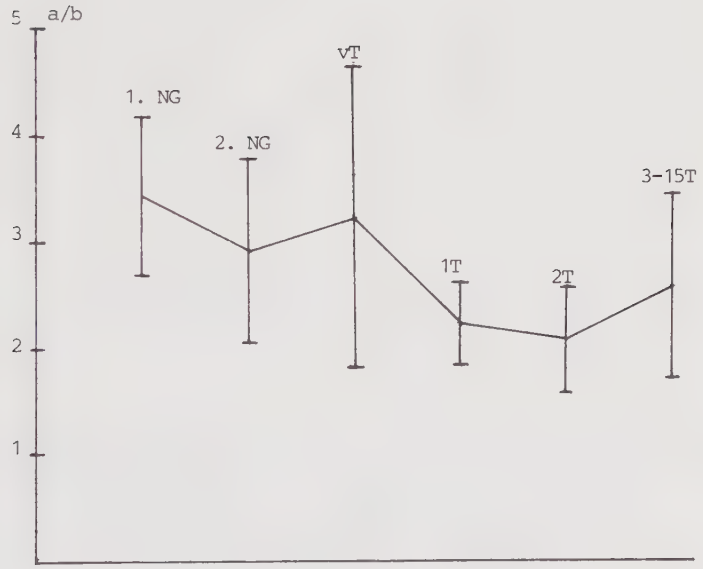

Abb. 4: Chemotaxis/Migration von Granulozyten mit dem Agarose-Test bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca vor und nach Injektion von Adriamycin und Vincristin. Auswertung nach dem Chemotaktischen Faktor.

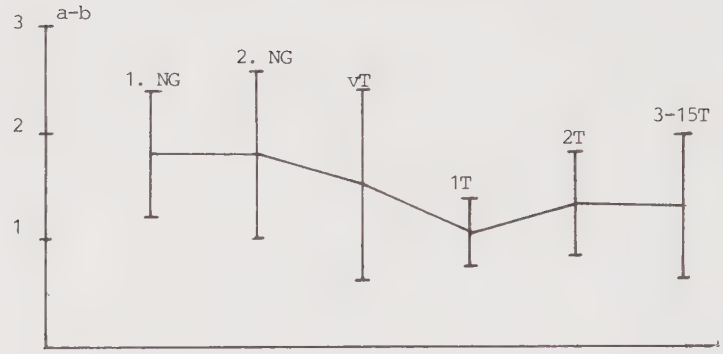

Abb. 5: Chemotaxis/Migration von Granulozyten mit dem Agarose-Test bei Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca vor und nach Injektion von Adriamycin und Vincristin. Auswertung nach der Chemotaktischen Differenz.

4. DISKUSSION

4.1. Morphologische, physiologische und biochemische Grundlagen

Die aktive Bewegung der Leukozyten gegen einen Konzentrationsgradienten ist eine wichtige Funktion im Entzündungsprozeß. Dabei sind drei Formen der Bewegung zu unterscheiden (36): "random movement", "Chemokinesis" und "Chemotaxis".

Unter random movement versteht man die Zellbewegung ohne Stimulans, unter Chemokinesis die gesteigerte, aber ungerichtete Bewegung in Anwesenheit einer aktivierenden Substanz und unter Chemotaxis die gerichtete Bewegung gegen einen Konzentrationsgradienten. Bis heute ist aber eine Chemotaxis in vivo nicht bewiesen (54, 64). In vitro lassen sich die verschiedenen Bewegungsarten auseinanderhalten. Die Unterscheidung in Chemokinesis und Chemotaxis ist wichtig, wenn man Substanzen auf ihre chemotaktischen Fähigkeiten untersuchen will.

Die erste Antwort auf einen Reiz besteht darin, einen Konzentrationsgradienten wahrzunehmen.

Nach McNAB und KOSHLAND (43) gibt es 2 Möglichkeiten dafür: einen Vergleich von zwei zeitlich verschiedenen Messungen nach Zurücklegung einer definierten Wegstrecke, oder den Vergleich von zwei Messungen durch am Zellkörper befindliche Rezeptoren. Im Gegensatz zu Bakterien benützen die Leukozyten die zweite Möglichkeit (73), die nach ZIGMOND et al. (68) Topotaxis genannt wird. ZIGMOND konnte nachweisen, daß bereits ein Konzentrationsunterschied

von 1 % vom vorderen bis zum hinteren Ende der Zelle wahrgenommen werden kann (70, 72).

Der chemotaktische Faktor wirkt auf wahrscheinlich spezifische Rezeptoren, wie sie z.B. für N-formyl-Peptide nachgewiesen wurden (65). Daraufhin kommt es zu einer Veränderung des Ruhepotentials der Zellmembran, welche durch Veränderungen der K-, Na- und Ca-Gradienten sowie durch intracelluläre Ca-Verschiebungen zustandekommen. Einen Überblick über diese und die folgenden biochemischen Vorgänge geben GALLIN, J. I. (26), SCHIFFMANN, E. und GALLIN, J. I. (54) sowie ZIGMOND, S. H. (74). Danach kommt es unter Met-Leu-Phe zu einer dosisabhängigen Erhöhung des Na-Influxes. Nach etwa 5 - 7 Min. nehmen der Na-Efflux und der K-Influx zu, können aber durch Ouabain gehemmt werden, was die Beteiligung der Na/K-ATPase vermuten läßt.

Ca^{2+}-Ionen sind für die Chemotaxis notwendig, wenn auch ihre Rolle im einzelnen unklar ist. So wurden sowohl Influx als auch Efflux von Ca beschrieben.

Mg^{2+}-Ionen spielen wahrscheinlich nur für Chemotaxis eine Rolle, nicht jedoch für Chemokinesis. Resultat dieser Vorgänge ist die Orientierung der Zelle in Richtung des chemotaktischen Gradienten. Während die Mikrotubuli nur für die Ausrichtung der Zellen notwendig sind, braucht die Zelle die Mikrofilamente für die aktive Ortsveränderung (25). Für die eigentliche Bewegung kommen folgende Schritte in Betracht (59): eine reversible Adhäsion, das Ausbreiten der Zelle (spreiten), indem sie Lamellipoden nach vorne ausstreckt, womit eine Polarisierung verbunden ist, und schließlich die Bewegung selbst. Letztere kann man selektiv auf zwei Arten beeinflussen: eine Hemmung der Chemotaxis mit hohen Dosen Actinomycin D (9) oder eine Hemmung der Lokomotion mit Cycloheximid (49), die aber nach

STOSSEL (59) nicht bewiesen werden konnte. Während die Zellen im fließenden Blut und im Medium rund sind (69), bildet sich unter Stimulation eine Polarisierung aus, indem vorne ein Pseudopodium ausgebildet wird, die Mitte den Kern enthält und hinten ein knopfartiger Schwanz entsteht (74). Dabei macht es keinen Unterschied, ob sich die Zelle zufällig oder gerichtet bewegt, also Chemokinesis oder Chemotaxis vorliegt.

Actin und Myosin-Proteine liefern die kontraktilen Kräfte für die Fortbewegung, während das Mikrotubulisystem stabilisierend bei der Bewegung wirkt und die Zelle ausrichtet (26, 54).

In diesen Prozeß können Substanzen an verschiedenen Stellen hemmend eingreifen (50): Die Komplementaktivierung kann unterdrückt, die Rezeptoren für den chemotaktischen Faktor durch Analoge blockiert, die Na/K-ATPase blockiert, die Oberflächenstruktur der Membran geändert, der Zellmetabolismus verändert und die Mikrofilamente an der Polymerisation und Formation gehindert werden.

Zahlreiche Substanzen wurden bisher darauf untersucht, ob sie chemotaktisch aktiv sind oder die Chemotaxis unterdrücken (50). Dazu gehören als chemotaktisch aktive Substanzen (74): Serumfaktoren, vorzugsweise ein C_5-Fragment, Bakterienmetabolite, Stoffe sensibilisierter Lymphozyten und Granulozyten sowie denaturiertes Protein. Formylmethionylpeptide (53) sind in sehr kleinen Konzentrationen wirksam, sie sind bis jetzt die stärksten chemotaktischen Substanzen. Nach NELSON (48) wird die chemotaktische Aktivität der hauptsächlich verwendeten Substanzen nach folgender Reihung beurteilt:

f-met-phe-ala > Zymosanaktiviertes Serum (59) > E. coli Staph. aureus > Cand. albicans.

Zu Substanzen, die die Chemotaxis unterdrücken, gehört neben Äthanol vor allem Cytochalasin B, das die Formation der Mikrofilamente und die zelluläre Lokomotion hemmt. Vincaalkaloide und Colchizin vermindern die Mikrotubulipolymerisation, indem sie den intracellulären CAMP-Spiegel erhöhen. Bei Corticoiden war nach in vivo Gabe nur die Chemotaxis von Eosinophilen, nicht jedoch von Neutrophilen vermindert (12).

4.2. Krankheiten mit verminderter Chemotaxis und Migration

Die Abwesenheit der neutrophilen Granulozyten von Geweben während 2-4 h erhöht die Infektionsgefahr inokulierter Bakterien um das 100.000 fache (51). Am häufigsten handelt es sich um Infektionen durch Staph. aureus, aber auch durch gram-negative Bakterien, Pilze und Staph. epidermidis (51).

Es gibt wenig frühe Entzündungsreaktionen, die klinische Manifestation verzögert sich. Obwohl das klinische Bild vielfältig ist, sind Sepsis und Meningitiden selten (26).

Störungen der Chemotaxis können durch Veränderungen des körpereigenen chemotaktischen Faktors oder der Zellen verursacht sein. Dabei können Defekte der Mediatoren oder im Komplementsystem, vor allem von C_3 und C_5 eine Rolle spielen (26). Hohe Inaktivatorspiegel gegen den chemotaktischen Faktor werden bei Erkrankungen wie M. Hodgkin, Sarkoidose, Zirrhose und einigen Nierenerkrankungen beobachtet (18).

Die zellulären Defekte wurden nach ihrer abnormen Funktion eingeteilt (26), eine sorgfältige Zusammenstellung dieser Dysfunktionen findet sich bei CLARK (13) und QUIE und

CATES (51). Danach werden a) primär zelluläre und b) durch zellgerichtete Inhibitoren ausgelöste Defekte unterschieden. Primär zelluläre Defekte wurden gefunden bei Chediak-Higashi-Syndrom, Lazy-Leukozyte-Syndrom, Diabetes Mell., rheumatoider Arthritis, bei Neugeborenen, Hyperimmunoglobulinämie E, kongenitale Ichthyosis, aktive Infektion, Hypophosphatämie, Hypogammaglobulinämie, Verbrennungen, Knochenmarkstransplantation, Down-Syndrom, idiopatische iuvenile Periodontitis, Actin-Dysfunktion und in einzelnen unklassifizierbaren Fällen (13).

Zellgerichtete Inhibitoren der Chemotaxis fand man beim Wiskott-Aldrich-Syndrom, beim IgA-Myelom und bei Neoplasien (63). Bei Mäusen wurde ein niedermolekularer, spezifisch die Makrophagenbewegung hemmender Inhibitor beschrieben, der aus dem Neoplasma gewonnen wurde (56).

Obwohl die biochemischen Grundlagen z. T. experimentell gut fundiert sind, bereitet es immer noch große Schwierigkeiten, diese den klinischen Krankheiten zuzuordnen.

Für unsere Belange sind folgende biochemischen Interaktionen wichtig: der Influx und Efflux von Ca^{2+}-Ionen wurde durch Cytochalasin B (23) und durch Lanthanium (5) gehemmt. Der durch den chemotaktischen Faktor verursachte Abfall des negativen Membranpotentials wird durch Hydrocortison geblockt (24). Weiterhin ist die Hemmung der Chemotaxis durch Verhinderung der Mikrotubuli-Aggregation unter bestimmten Umständen bekannt (3). Eine verminderte Funktion der Mikrofilamente ist die vermutliche Ursache der herabgesetzten Chemotaxis unter Cytochalasin B (68). Weiterhin sind Veränderungen im Spiegel der cyclischen Nucleotide von großem Einfluß (34).

Das Verhältnis von Chemotaxis und Migration zu Tumoren ist noch nicht geklärt. Jedoch konnte gezeigt werden, daß Tumoren mit einer hohen Zahl von Makrophagen am wenigsten häufig metastasieren und daß das Einströmen von Makrophagen in die Tumoren zu ihrer Zerstörung führen kann (19, 33, 57). Obwohl diese Untersuchungen sich auf Monozyten erstrecken (57), darf die Möglichkeit, daß auch die Granulozyten in ihrem chemotaktischen Verhalten verändert sind, nicht ausgeschlossen werden.

4.3. Überblick über die gebräuchlichen Methoden

Chemotaxis von Leukozyten wurde vor ca. 100 Jahren von dem deutschen Arzt Theodor LEBER entdeckt (26). Seitdem hat dieses Gebiet die Forschung beschäftigt.

Einen ersten Versuch zur Quantifizierung der Beobachtung machte McCUTCHEON (42), indem er den Weg einzelner Zellen gegen einen chemotaktischen Gradienten aufzeichnete und den Quotienten zwischen der kürzesten Strecke vom Ausgangs- zum Zielpunkt der Zelle in Richtung des Gradienten und dem tatsächlich zurückgelegten Weg bildete. Diese direkte Methode wurde von ZIGMOND und HIRSCH weiter verbessert (69, 73). Vorteile dieser Methode sind die direkte Beobachtung der Zellen, ihrer Beweglichkeit und der morphologischen Veränderung sowie die Unterscheidbarkeit von Chemotaxis und Chemokinesis. Nachteile sind vor allem der große Zeitaufwand und die mangelnde Übersicht über eine große Zellzahl, sodaß die Quantifizierung erschwert ist. BOYDEN führte 1962 einen Test ein (6), der eine quantitative Messung der Chemotaxis ganzer Populationen in Leukozyten-Suspensionen mit verhältnismäßig geringem Zeitaufwand ermöglichte. Er verwendete dazu eine Kammer,

die durch einen Mikroporenfilter in zwei Teile getrennt wird. In dem oberen Kompartment befindet sich die Zellsuspension, in dem unteren die chemotaktische Lösung. Die Zellen können dann durch den Filter hindurch in Richtung des Gradienten wandern. Man zählt die Zellen, die auf der Unterseite des Filters nach einer definierten Inkubationszeit gewandert sind. Diese Technik hat sich in kurzer Zeit weit verbreitet und wurde vor allem dazu verwendet, eine große Zahl von Substanzen auf ihre chemotaktischen Fähigkeiten hin zu untersuchen. Allerdings stellten ZIGMOND und HIRSCH klar (69), daß bei dieser Methode nicht die reine Chemotaxis, sondern vielmehr Chemotaxis und Chemokinesis zusammen gemessen werden. Sie verwendeten die sog. "leading-front"-Methode, bei der die Entfernung gemessen wird, die die vordersten zwei Zellen in den Filter hinein zurückgelegt haben, wenn das Experiment so früh gestoppt wird, daß keine Zelle ihn ganz durchwandert hat.

Als Vorteil dieser Methode werden genannt: besseres Auflösungsvermögen, d.h. schon ein schwacher chemotaktischer Reiz kann erfaßt werden, während die Zellen bei der "lower surface"-Methode zu lange brauchen, um in einem solchen Fall den Filter zu durchwandern. Zweitens ist es mit dieser Methode nicht möglich, daß die Zellen von der Unterseite des Filters "abtropfen", wie es bei der "lower-surface"-Methode beschrieben wurde (71). Die Möglichkeit des Abtropfens haben andere Experimentatoren dadurch ausgeschlossen, daß man unter den eigentlichen Filter einen zweiten einlegte, dessen Poren für einen Zelldurchtritt zu klein sind. Es gibt aber auch sorgfältige Arbeiten, die zeigen, daß bei genügend kurzer Inkubationszeit keine Zellen verloren gehen (1). Weitere Vorteile der "leading-front"-Methode sind die Möglichkeit, Chemotaxis und Chemokinesis zu unterscheiden (71) sowie die gute Reproduzierbarkeit. Letztere beruht vor allem darauf, daß der

Test unempfindlich gegen wechselnde Zellzahlen in der Suspension ist. Eine weitere Veränderung der Methode nach BOYDEN führte GALLIN ein (22), der mit ^{51}Cr markierte Leukozyten verwendete. Der Vorteil dieser Methode ist, daß sie zuverlässig in klinischen Studien angewendet werden kann, zeitsparend ist und von Auswertungsfehlern seitens des Untersuchers weitgehend frei ist. Der Nachteil ist der hohe technische Aufwand. Eine andere Modifikation der Boydenkammer wurde von MADERAZO und WORONICK vorgeschlagen (39), die den Filter in Schichten von 10 µm durchzählten und das Produkt des Abstandes mit den dabei gezählten Zellen bildeten. Die Summe aller dieser Produkte wurde durch die ermittelte Gesamtzellzahl dividiert. Dadurch werden sowohl die Zahl als auch die Entfernung der wandernden Zellen in die Auswertung einbezogen. Nachteile sind der technische und zeitliche Aufwand.

Ein Test, der nicht auf der Methode von BOYDEN basiert, wurde von NELSON et al. vorgeschlagen (47). Er basiert auf der Migration von Zellen unter Agarose, wie es erstmals von CARPENTER beschrieben wurde (8). Nach der Methode von NELSON wird nicht nur CHEMOTAXIS erfaßt, sondern auch chemokinetische Einflüsse spielen eine Rolle (74). Methodisch werden zwei Strecken gemessen, die Spontanmigration und die eigentliche Chemotaxis. Bisher ist nicht klar, ob der Quotient aus beiden Werten ("Chemotaktischer Index") oder die "Chemotaktische Differenz" dieser beiden Werte aussagefähiger ist (48). Weiterhin ist umstritten, ob diese Methode, deren Vorzüge in der einfachen Handhabung liegen, wirklich die gleichen zellulären Vorgänge mißt wie die Millipore-Methode (48). Bisher gab es kaum Vergleichsmöglichkeiten.

4.4. Begründung für die Wahl unserer Methode

Die Fragestellung war es, zu untersuchen, ob eine bestimmte, in der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen zum Zeitpunkt der Untersuchung angewandte Polychemotherapie Auswirkungen auf die Funktion der Leukozyten hat und ob diese Auswirkungen so stark sind, daß damit eine erhöhte Infektionsgefahr durch herabgesetzte Leukozytenfunktionen gegeben ist.

Daher wurden in unserer Studie mehrere Funktionen anhand etablierter Tests zugleich untersucht, um einen möglichst breiten, vergleichenden Überblick zu erhalten.

Unsere Aufgabe war nicht die Untersuchung einer Substanz auf ihre chemotaktischen Fähigkeiten oder Grundlagen biochemischer Vorgänge bei der Migration oder Chemotaxis zu untersuchen. Für eine solche Fragestellung wäre es zweifelsohne notwendig, eine Methode zu wählen, die die Migration von der reinen Chemotaxis unterscheidet. Dafür liegen als Methoden bestimmte Modfikationen der Boydenkammer, des Nelson Testes und die direkte Beobachtung von Zellen vor, die man hätte wählen müssen.

Für unsere Fragestellung, die an den klinischen Auswirkungen orientiert ist, erscheint jedoch die stimulierte Migration und die reine Chemotaxis als eine enge funktionelle Einheit, auf deren Interaktion es ankommt.

Die direkte Methode schied wegen des erheblichen Zeitaufwandes und wegen zahlreicher weiterer Paralleluntersuchungen aus. Die Methode mit den markierten Granulozyten konnten wir nicht durchführen, da uns dazu die technischen Möglichkeiten fehlten.

So entschlossen wir uns, parallel die modifizierte Methode nach BOYDEN und diejenige nach NELSON zu verwenden. Da die beiden Tests nicht sicher die gleichen Funktionen erfassen und bisher selten im Vergleich verwendet wurden,erschien uns ein Vergleich lohnenswert.

Bei Verwendung der Boydenkammer entschieden wir uns für die von CATES, RAY und QUIE beschriebene Methode (11). Wie schon oben ausgeführt, war es für unsere Fragestellung wichtig, die funktionelle Einheit von Migration und Chemotaxis zu untersuchen. Ein entscheidender Nachteil der leading front-Methode hierbei ist es, daß nicht die Anzahl der wandernden Zellen erfaßt wird, sondern nur die Entfernung der zwei am weitesten gewanderten Zellen. Dieser Nachteil wird in der von MADERAZO und WORONICK entwickelten Methode umgangen (39). Sie ist aber auch zeitaufwendig. Bei Vorversuchen gelang es uns zudem nicht, die Filter in befriedigender Weise auszuwerten. Das lag einerseits daran, daß sie nicht immer in der erwünschten Weise klar wurden beim Färben und Fixieren, zum anderen konnten wir nur ungenau die Abstände der Ebenen bestimmen. Auch ist es bei der Größe der Leukozyten nicht genau zu sagen, welche Zelle in einer Ebene ist und welche nicht. Dadurch ergaben sich nicht unerhebliche Abweichungen in der Auswertung, die auch durch Auszählen von zwei Untersuchern nicht ausgeglichen werden konnten. Bei der von uns angewandten Methode ergaben sich zwei Schwierigkeiten:

a) die Abhängigkeit der Ergebnisse von der Zellzahl. Dem begegneten wir, indem wir die Zellzahl in der Suspension standardisierten auf einen Wert von 12,5 x 10^6 Zellen/ml. Im Prinzip ist es für unsere Fragestellung wünschenswert, zu sehen, in welchem Umfang die Population am Migrations-Chemotaxis-Prozeß teilnimmt, d.h. inwiefern wirklich eine größere Anzahl von Granulozyten in das Entzündungsgebiet einwandert.

b) Die zweite Schwierigkeit betraf das Abtropfen von der Filterunterseite. Wir untersuchten in Vorversuchen die im unteren Kompartment befindliche Flüssigkeit auf etwaige darin enthaltene Zellen. Bei einer verhältnismäßig kurzen Inkubationszeit von 90 Min. konnten wir in Übereinstimmung mit WILKINSON und ALLAN (64) keinen Verlust durch Abtropfen feststellen.

Bei dem Migrationstest unter Agarose wählten wir aus den gleichen, oben aufgeführten Gründen das Auswertungssystem von NELSON (47), vor allem, um die Möglichkeit des Vergleichs zu wahren.

4.5. Zytostatische Therapie

In der Med. Universitätsklinik Tübingen werden Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca nach dem AVC-Schema behandelt, das die Substanzen Adriamycin, Vincristin und Cyclophosphamid umfaßt (67, 68) und entscheidende Vorteile gegenüber einer Einmedikamententherapie aufweist (7). Ein Kombinationswechsel (41) kann notwendig werden, wenn die toxische Gesamtdosis von Adriamycin erreicht wird oder wenn einzelne Bestandteile der Kombination ineffektiv werden oder Toxizität zeigen (7, 10). Das aus diesem Grunde in Tübinen ebenfalls verwendete CMF-Schema bleibt aber in dieser Untersuchung unberücksichtigt.

4.5.1. Wirkungsmechanismus, Pharmakokinetik und Nebenwirkungen der verwendeten Zytostatika

a) Adriamycin

Die zytotoxische Wirkung dieses Anthracyclinantibiotikums beruht nach den heutigen Kenntnissen auf zwei Mechanismen: Einerseits wird es sehr rasch in die Zelle aufgenommen und bindet sich dort jeweils an zwei komplementäre Basenpaare der DNA, indem es sich zwischen die beiden Stränge der Doppelhelix einschiebt. Dabei wird das Zucker-Phosphat-Rückrat entspiralisiert. Das entstehende Molekül kann nicht mehr als Schablone für die Polymerase dienen. In sehr viel geringerem Maße bindet sich Adriamycin auch an die RNA. Andererseits wird diskutiert, ob die Antitumoraktivität des Adriamycin durch seine zellmembranzerstörende Wirkung entsteht. Durch seine Chinon-Hydrochinonstruktur kann Adriamycin Elektronen aufnehmen und geht dadurch in eine Semichinonstruktur über. Bei Zugabe von Adriamycin zu Lebermikrosomen wird die Oxidation von NADPH und der Übergang von Elektronen auf O_2 begünstigt, was zur Entstehung von Superoxidraikalen (O_2^-) führt. Die DNA-Ketten werden also nicht nur durch die Einschiebung blockiert, sondern auch durch die Erzeugung freier Radikale in ihrer unmittelbaren Umgebung auseinandergerissen. Adriamycin wirkt in allen Zyklusphasen zytotoxisch, am sensibelsten ist die S-Phase (14, 15, 17, 29, 46).

Nach i.v.-Applikation verteilt es sich schnell. Schon nach 5 Min. sind Adriamycin und seine Metaboliten Adriamycinon und Adriamycinol in den Leukozyten des Blutes nachweisbar. Innerhalb der ersten zwei Tage nach der Applikation steigt ihre Konzentration dort noch weiter an und erreicht Werte, die 80-250-fach höher liegen als die Konzentration im Plasma (17). Ebenfalls innerhalb von Minuten verteilen sich Adriamycin und seine Metaboliten bevorzugt in die

Organe Herz, Niere, Lunge, Leber, Milz, Knochenmark und Pankreas.

Die Elimination zum Teil unverändert, größtenteils jedoch in Form inaktivierter Metabolite erfolgt triphasisch mit Halbwertszeiten von 12 Min., 3,3 h und 30 h größtenteils über die Leber (17, 29, 62).

An reversiblen unerwünschten Wirkungen kennt man die starke, generelle Myelosuppression besonders in der zweiten Therapiewoche, die sich als ausgeprägte Leukopenie manifestiert, sowie gastrointestinale Störungen und Alopezie.

Charakteristisch und nicht reversibel sind Cardiomyopathien. Im Gegensatz zur akuten Form, die direkt nach Applikation auftritt und innerhalb eines Tages wieder verschwindet, hat die infolge der dosisbezogenen Toxizität ab einer Gesamtdosis von 550 mg/m^2 auftretende chronische Cardiomyopathie eine Mortalität von ca. 50 %.

Bei der akuten Form werden Hypotonie, Tachykardie und Arrhythmien beobachtet, die innerhalb von Minuten nach Applikation auftreten und damit die außerordentlich schnelle Verteilung des Adriamycins ins Gewebe zeigen. Die dafür verantwortlich gemachte Lipidperoxidation wird nicht vom Anthracyclinmolekül selbst verursacht. Erst, wenn der Chinonring der Anthracycline nach Reduktion und folgender Autooxidation die Bildung von H_2O_2 und evtl. auch anderer reaktiver O_2-Moleküle bewirkt, kommt es zur Lipidperoxidation und zu einer Steigerung des HMPS über die Oxidation von NADPH. Dabei binden sich die Anthrocycline an verschiedene Phospholipide: so an Cardiolipin, den Hauptbestandteil der Mitochondrienmembran (46) und an Zell-

membranen, was z.B. an Erythrozyten zu elektronenmikroskopisch sichtbaren Membranveränderungen führt (46, 52). Eine dosisabhängige Lipidperoxidation wurde auch an menschlichen Thrombozyten gefunden (61). Spezifisch gehemmt werden kann sie durch α-Tocopherol, Ubichinon, N-Acetylcystein und Acetylsalicylsäure (29, 45). Durch die Bindung an Membranstrukturen kommt es zu Permeabilitätsänderungen: Anstieg von Na^+ und Ca^{2+}-Ionen in der Zelle, Hemmung der Aktivität der Na/K-Membran-ATPase und Hemmung aller Reaktionen, die Coenzym Q benötigen (20, 46).

Als Ursache für die chronische Cardiomyopathie wird in erster Linie die Bindung des Adriamycins an die Zell-DNA mit einer folgenden Hemmung der RNA- und Proteinsynthese verantwortlich gemacht, außerdem in geringerem Ausmaß die Lipidperoxidation (17, 20, 29, 38, 40, 45, 46, 52, 61).

b) Vincristin

Dieses Pflanzenalkaloid gehört neben Vinblastin, Colchizin und Podophyllotoxin zu den Mitosegiften, die eine hohe Affinität zu der entscheidenden Komponente der zellulären Mikrotubuli, dem Tubulin, aufweisen. Durch Bindung von Vincristin an Tubulin im Verhältnis 1:1 entstehen regelmäßige Kristalle; damit kommt es zur Auflösung der Mikrotubuli. Durch Auflösung der Mitosespindel in der Mitosephase wird die Zelle in der Metaphase angehalten, die Chromosomen verteilen sich im Zytoplasma oder treten in völlig irregulären Gruppierungen auf. Diese Vorgänge führen offensichtlich zum Zelltod (4, 14, 15, 28, 30, 62).

Nach i.v. Applikation erreicht Vincristin innerhalb von Minuten einen maximalen Plasmaspiegel. Es wird zu über 50 % an die geformten Blutzellen gebunden, und zwar stärker an Thrombozyten als an Erythrozyten und Leukozyten. Nach

aktivem Transport in die Zelle existiert es dort in mindestens zwei Fraktionen:

a) mit hoher Affinität zu Tubulin an dieses gebunden,
b) austauschbar und frei, und evtl.
c) an andere Proteine gebunden.

Die Elimination erfolgt überwiegend über die Galle. Nach ca. 2 h sind in der Leber maximale Konzentrationen erreicht, nach ca. 72 h ist die Exkretion abgeschlossen (4, 28).

Bei den unerwünschten Wirkungen stehen neben einer schwächeren Knochenmarksdepression die periphere Neuropathie mit Kribbeln in den Extremitäten, Muskelschwäche, Reflexverlust, Ataxie, Muskelkrämpfe, neuritische Schmerzen, Obstipation u.a. im Vordergrund. Als Ursache wurden Demyelinisierungen und Degenerationen von Nervenzellen sowie Störungen im axonalen Transport beschrieben. Biochemisch wurden eine reduzierte Ca-Aufnahme, ein unverändertes Phospholipidmuster und ein Anstieg der Plasma-CPK gefunden. Immunologisch findet sich eine Hemmung der Antikörperbildung gegen Serumalbumin, verzögerte Hypersensibilitätsreaktionen sowie eine verminderte IgM-Sekretion. Für unsere Fragestellung ist neben der Interferenz mit der Lysosomalen Degranulation und der Bildung von Verdauungsvakuolen vor allem die Affinität zu Tubulin wichtig. Dadurch werden Veränderungen der Zellmorphologie, Veränderungen der Beweglichkeit der Zellen sowie Mitose- und Meiosevorgänge beeinflußt (4, 14, 28, 30, 40).

c) Cyclophosphamid

Die Eigenschaften von Cyclophosphamid seien hier nur kurz dargestellt, da die Substanz im AVC-Schema erst am dritten Tag der Therapie gegeben wird, während uns vor allem die ersten beiden Tage interessierten. Es entfaltet seine Wirkung erst in Geweben mit hoher Mitoserate, wo die Reparaturenzyme der DNA nicht mehr in der Lage sind, die durch die kovalenten Bindungen an Cyclophosphamid kreuzweise verknüpften DNA-Einzelstränge wieder voneinander zu lösen. Dabei sind die späte G_1- und die S-Phase am empfindlichsten (14, 15, 16, 27, 62).

Nach oraler Applikation entwickelt Cyclophosphamid erst nach oxidativer Metabolisierung in der Leber über Aldophosphamid in Phosphoramidmustard und Acrolein seine Antitumoraktivität. Die sehr langsame Elimination erfolgt größtenteils in Form inaktiver Metabolite über die Niere (16, 27, 62).

Durch Schädigung der Leukozytenstammzellen im Knochenmark kommt es nach ca. 10-14 Tagen zu einer erheblichen Leukopenie. Nach ca. 21 Tagen haben sich die Leukozytenzahlen im peripheren Blut wieder normalisiert. Weitere Wirkungen auf die Leukozyten sind die nach einigen Tagen signifikant erhöhten Döhle-bodies, die etwa 2-3 Monate nachweisbar bleiben, sowie die bisher ungeklärte Beobachtung, daß Cyclophosphamid eine Erholung des durch andere Medikamente geschädigten Knochenmarks stimulieren kann (16, 27, 35).

4.6. Diskussion der Ergebnisse

Unsere Untersuchungen zeigten zunächst Unterschiede in der Chemotaxis/Migration beider Normgruppen (1NG und 2NG), die zwar statistisch nicht signifikant, aber nach Abb. 3 in der Tendenz deutlich sichtbar waren. Sie stimmten exakt mit den Ergebnissen für Phagozytose und Adhäsion (Arbeit von R. Knapp) überein. Diese Unterschiede sind u. E. auf das unterschiedliche Lebensalter in den Kollektiven zurückzuführen.

Vergleicht man die im Lebensalter gleichen Kollektive 2NG und vT (Patientinnen vor Therapie), so ergab sich für die Chemotaxis/Migration kein Unterschied. Gestützt wird diese Meinung auch durch die Tatsache, daß 1NG gegenüber vT sowie 3-15T signifikant ist, nicht jedoch 2NG. Dieser Unterschied zwischen den Normkollektiven betraf alle untersuchten Leukozytenfunktionen. Bei der Adhäsion ließ er sich signifikant nachweisen, bei der Phagozytose war ein Trend numerisch zu finden (s. Promotionsarbeit R. Knapp).

Die Möglichkeit, daß das Mamma-Carcinom als solches die Fähigkeit der Leukozyten zur Migration/Chemotaxis herabsetzt, ist nach diesen Ergebnissen nicht mit Sicherheit auszuschließen, jedoch aufgrund der statistischen Auswertung eher unwahrscheinlich. Deutlich wird hingegen, daß in den beiden ersten Tagen nach Therapiebeginn mit dem AVC-Schema, d. h. nach i.v. Injektion von Adriamaycin und Vincristin, die Migrations-Chemotaxisfähigkeit herabgesetzt ist. Die Adhäsion war ebenfalls am ersten Tag nach Therapiebeginn reduziert, während die Phagozytose sich erst beim Kollektiv 2T verringerte.

Demgegenüber ist bis zum 15. Tag ein Einfluß des Cyclophosphamids auf die Chemotaxis nicht festzustellen. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen bei Adhäsion und Phagozytose, bei denen kein Unterschied zwischen 2NG und vT gefunden werden konnte.

In der Zeit vom 3.-15. Tag nach Therapiebeginn steigt die chemotaktische Fähigkeit wieder an, erreicht jedoch nicht wieder den Ausgangspunkt. Die Adhäsion normalisierte sich nach 3-15 Tagen fast vollständig, während die Erholung der Phagozytose offensichtlich längere Zeit in Anspruch nahm. Der Anstieg der Migration/Chemotaxis in dieser Zeit kann am besten durch die Zunahme funktionstüchtiger, nicht oder weniger vorgeschädigter Granulozyten im peripheren Blut erklärt werden, wobei doch festzuhalten ist, daß die Erholungszeit dieser Fähigkeit länger dauert als die der Adhäsion. Dies kann aus dem komplexen Funktionsmuster der Migration sowie den Eigenschaften der verwendeten Zytostatika erklärlich sein.

Obwohl die von uns festgestellten Veränderungen der granulozytären Funktion unter der AVC-Therapie signifikant waren, war der Unterschied doch nicht so groß, daß wesentliche klinische Komplikationen durch diese Verminderung erwartet werden müßten. Das stimmt mit der klinischen Beobachtung überein. Ein Leukozytenabfall wurde nicht beobachtet.

Die zum Teil erheblichen Standardabweichungen - verglichen mit der Literatur - lassen sich dadurch erklären, daß erhebliche interindividuelle Abweichungen möglich sind. Wo in der Literatur kleinere Fehler angegeben wurden, wurde die Tag-zu Tab-Abweichung einer Testperson oder eine Blutprobe in mehreren Experimenten gemessen. Mehrfache

Blutentnahmen mußten bei unseren Patientinnen jedoch unterbleiben.

Im Test nach NELSON haben wir auf Vorschlag des Autors zwei Auswertungssysteme verwendet, da in der Literatur noch nicht sicher ist, welches die größere Relevanz hat.

Bei der Auswertung mit der Chemotaktischen Differenz konnten wir im multiplen t-Test, der immer zuerst auf die Ergebnisse angewendet wurde, bevor wir den Einzelvergleich nach BONFERONI durchführten, keine Signifikanzen feststellen. Es wird damit wahrscheinlich, daß die chemotaktische Differenz kein adäquates Auswertungskriterium ist.

Bei der Auswertung nach dem chemotaktischen Faktor war lediglich die erste Normgruppe gegen die Gruppe "Ein Tag nach Therapiebeginn" (1T) signifikant unterschiedlich. Da die kleinen Unterschiede und fehlenden Signifikanzen nicht auf besonders hohe Standardabweichungen zurückgeführt werden können, scheint dieses Ergebnis die kritische Meinung zu unterstützen, wonach der Agarose-Test wesentlich weniger sensibel ist als der Test mit der Boydenkammer (48). Es ist offensichtlich, daß die bereits in der Boydenkammer nicht sehr erheblichen Unterschiede mit dem Agarose-Test nicht erfaßt werden können. Lediglich der zu erwartende stärkste Unterschied zwischen der ersten Normgruppe und der Gruppe ein Tag nach Therapie konnte nachgewiesen werden.

Ein Vergleich unserer Ergebnisse mit der Literatur ist schwer möglich, da es unseres Wissens keine Untersuchungen der Chemotaxisfähigkeit von Granulozyten bei Patientinnen mit Mamma-Carcinom gibt. Untersuchungen bei soliden Tumoren wurden nur mit Monozyten ausgeführt, die un-

tersuchten Kollektive waren nicht streng nach Krankheitseinheiten gegliedert.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Chemotaxis/Migration, Adhäsion und Phagozytose der Granulozyten durch Adriamycin/Vincristin in gleicher Weise beeinflußt wurden, wobei zeitliche und quantitative Unterschiede zu finden waren. Da sich bezüglich dieser Granulozyten-Funktionen beide Normgruppen immer in gleicher Weise unterschieden, wurde ein Einfluß des Lebensalters und möglicherweise des Geschlechtes wahrscheinlich. Ein Einfluß des Malignoms auf eine der untersuchten Funktionen wurde nicht nachgewiesen und ist eher unwahrscheinlich. In Abhängigkeit von der Zytostatika-Applikation ist ein Abfall bei allen Teilfunktionen zu verzeichnen, der bei der Phagozytose allerdings später einsetzt als bei Adhäsion und Chemotaxis. Die Erholung beginnt am dritten Tag nach Injektion und ist bei der Adhäsion entsprechend dem einfacheren Funktionsmuster am ehesten abgeschlossen, bei der Phagozytose dauert die Erholung am längsten.

Es ist aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht eindeutig möglich, die gefundenen Veränderungen auf die einzelnen Zytostatika zu beziehen.

Auszuschließen ist eine Wirkung des Cyclophosphamids, welches erst vom 3. Tag an gegeben wurde. Eine toxische Knochenmarkschädigung spielt wahrscheinlich in den ersten beiden Tagen nach Therapiebeginn keine entscheidende Rolle. Vielmehr setzen nach unserer Meinung die Veränderungen direkt an den ausgereiften Granulozyten an. Dafür kommt die toxische Wirkung des Adriamyxins in erster Linie infrage, da dessen Hydrochinonstruktur zur Bildung rasch auftretender chemischer Radikale in der Lage ist. In

zweite Linie können die Veränderungen durch Vincristin verursacht werden, das einen Direkteffekt auf kontraktile Elemente besitzt, welche bei allen untersuchten Funktionen eine entscheidende Rolle spielen. Ferner greift Vincristin in die Zellmitose ein und hat damit eine mehrtägige Latenzzeit bis zum Auftreten von Störungen seitens der Granulozytopoese. Diese Tatsache erklärt u. U., warum die Erholungsvorgänge bei den einzelnen Funktionen etwas unterschiedlich schnell ablaufen. Man kann annehmen, daß die Restitutio durch ins periphere Blut nachströmende Granulozyten bewirkt wird und eventuell durch die Knochenmarksdepression verzögert wird.

Eine Weiterführung der hier begonnenen Untersuchungen müßte darin bestehen, die Einzelwirkung von Adriamycin und Vincristin zu untersuchen und die biochemischen Veränderungen zu finden.

Aufgrund von Longitudinalstudien müßte es möglich sein, die erheblichen interindividuellen Streuungen zugunsten einer genaueren Aussage zu verringern.

Von Interesse wäre, Schicksal, Verbleib und eventueller Abbauort der vorgeschädigten Granulozyten kennenzulernen.

Auch sollte eine mögliche Beziehung zwischen Funktionseinschränkung der Leukozyten und Infektanfälligkeit der Patienten Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Wir untersuchten Chemotaxis/Migration an isolierten Leukozyten von Normalpersonen und Patientinnen mit metastasierendem Mamma-Ca. Diese Arbeit stellt einen Teil der zusammen mit R. Knapp durchgeführten Experimente dar. R. Knapp beschreibt die Ergebnisse der Tests Adhäsion, Phagozytose und Killing.

Wir fanden folgende Ergebnisse:

1. Zwischen beiden Normkollektiven bestand ein deutlicher Unterschied der Granulozyten-Chemotaxis/Migration. Dieser Unterschied läßt sich nach unserer Meinung vor allem auf das unterschiedliche Alter der Probanden zurückführen.

2. Zwischen den unbehandelten Patientinnen mit Mamma-Carcinom und dem Kollektiv gleichalter gesunder Frauen waren Chemotaxis/Migration der Granulozyten nicht unterschiedlich.

3. Nach Therapie mit Adriamycin und Vincristin kam es zu einem signifikanten Abfall der Chemotaxis/Migration.

4. Im Verlaufe der folgenden zwei Wochen nach Zytostatika-Gabe normalisierte sich die Chemotaxis wieder.

5. Trotz der nachgewiesenen Funktionsminderung der Granulozyten kam es in den ersten Tagen nach Therapiebeginn nicht zu einer klinisch nachweisbaren Resistenzschwäche. Die Leukozytenzahl im peripheren Blut änderte sich während der Zytostatika-bedingten Funktionseinschränkung nicht.

6. Der zeitliche Verlauf der Werte läßt darauf schließen, daß nach drei Tagen gesunde Granulozyten ins periphere Blut nachströmen.

6. LITERATUR

(1) BAUM, J.; MOWAT, A. G.; KIRK, J. A.: A simplified method for the measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from human blood. J. Lab. Clin. Med., 1971; 77: 501-509

(2) BECKER, E. L.; DAVIS, A. T.; ESTENSEN, R. D. and QUIE, P. G.: Cytochalasin B.: IV. Inhibition and stimulation of chemotaxis of rabbit and human polymorphonuclear leukocytes. J. Immunol., 1972; 108: 396-402

(3) BECKER, E. L. and SHOWELL, H. J.: The ability of chemotactic factors to induce lysosomal enzyme release: II. The mechanism of release. J. Immunol., 1974; 112: 2055-2062

(4) BENDER, R. A.: Vinca Alkaloide. In PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy. The EORTC Cancer chemotherapy annual 1, excerpta medica, 1979; S. 93-107

(5) BONCEK, M. M. and SNYDERMAN, R.: Calcium influx requirement for human neutrophil chemotaxis: Inhibition by lanthanium chloride. Science, 1976; 193: 905-907

(6) BOYDEN, S.: The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. J. Exp. Med., 1962; 115: 453-466

(7) BRUNNER, K. W.: Present status of combination chemotherapy in advanced breast cancer. In: Antibiotics and chemotherapy: Application of Cancer chemotherapy. Vol.24; S. Karger, Basel, 1978; S. 173-88

(8) CARPENTER, R. R.: In vitro studies of cellular hypersensitivity. J. Immunol., 1963; 91: 803-818

(9) CARRUTHERS, B. M.: Leukocyte motility: Effect of absence of glucose in medium; effect of presence of desoxyglucose, dinitrophenol, puromycin, actinomycin D and trypsin on the response to chemotactic substance; effect of segregation of cells from chemotactic substance. Can. J. Physiol. Pharmacol., 1967; 45: 269-280

(10) CARTER, S. K.: Chemotherapy of Breast Cancer: Current status. In: HENSON, J. C.; MATTHEIEM, W. H.; ROSENCWEIG, M.: Breast Cancer: Trends in Research and Treatment. Raven Press, N. Y.; 1976; S. 193-217

(11) CATES, K. L.; RAY, L. E.; QUIE, P. G.: Modified Boyden Chamber method of Measuring polymorphonuclear leukocyte chemotaxis. In: GALLIN, J. I.: QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; S. 67-71

(12) CLARK, R. A. F.; GALLIN, J. I.; FAUCI, A. S.: Effects of in vivo Prednisone on in vitro eosinophil and neutrophil adherence and chemotaxis. Blood, 1979; 53: 633-641

(13) CLARK, R. A. F.: Disorders of Granulocyte Chemotaxis. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; S. 329-356

(14) CLARYSSE, A., KENIS, G. and MATHÉ, G.: Cancer Chemotherapy. In: Recent Results in Cancer Research, Vol. 53; Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976; 55-58

(15) CLARYSSE, A.; KENIS, G. and MATHÉ, G.: Classification of Chemotherapeutic agents according to their effect of the cell cycle. In: Recent Results in Cancer Resea-ch, Vol. 53; Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1976; 101-111

(16) CONORS, T. A.: Alkylating drugs, nitrosaurea and dialkyltriazenes. In: PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy. The EORTC Cancer chemotherapy annual 1, Excerpta medica, Amsterdam, 1979; S. 25-56

(17) EHNINGER, G.; STOCKER, H.-J.; PROKSCH, B.; WILMS, K.: Die Pharmakokinetik von Adriamycin und Adriamycinmetaboliten. Klin. Wschr., 1980; 58: 927-34

(18) VAN EPPS, D. E.; WILLIAMS, R. C.: Serum inhibitors of leukocyte chemotaxis and their relationship to skin test allergy. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 237-253

(19) EVANS, R. and ALEXANDER, P.: Mechanism of immunologically specific killing of tumor cells by macrophages. Nature, 1972; 236: 168-170

(20) FERRANS, V. J.: Overview of cardiac pathology in relation to anthracycline cardiotoxicity. Cancer Treat. Rep., 1978; 62: 955-61

(21) FRANKEL, G. S. and GUNN, D. C.: The Orientation of Animals. Dover Publications, Inc., N. Y.; 1961; 35-90, 270-291, 317-318

(22) GALLIN, J. I.; CLARK, R. A. and KIMBALL, H. R.: Granulocyte chemotaxis: An improved in vitro assay employing 51-Cr.-labelled granulocytes. J. Immunol., 1973; 110: 233-240

(23) GALLIN, J. I. and ROSENTHAL, A. S.: The regulatory role of divalent cations in human granulocyte chemotaxis: Evidence for an association between calcium exchange and mikrotubule assembly. J. Cell. Biol., 1974; 62: 594-609

(24) GALLIN, J. I.; DUROCHER, J. R. and KAPLAN, A. P.: Interaction of leukocyte chemotactic factors the cell surface: I. Chemotactic factor-induced changes in human granulocyte surface charge. J. Clin. Invest., 1975; 55: 967-964

(25) GALLIN, J. I.; GALLIN, E. K.; MALECH, H. L.; CRAMER, E. B.: Structural and jonic events during Leukocyte Chemotaxis. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978, 123-142

(26) GALLIN, J. I.; WRIGHT, D. G.; MALECH, H. L.; DAVIS, J. M.; KLEMPNER, M. S.; KIRKPATRICK, C. H.: Disorders of Phagocyte Chemotaxis; NIH-Conference. Ann. Int. Med., 1980; 92: 520-538

(27) GOODMAN GILMAN, A.; GOODMAN, L. S.; GILMAN, A.: The Pharmacological Basis of therapeutics. Macmillan, N. Y., 1980; 1256-66

(28) ders.: 1287-90

(29) ders.: 1290-93

(30) GREENE, W. H.: Supportive Care in the Cancer Patient. Kap. Infection. In: BECKER, F. F.: Cancer 5, Plenum Press N. Y., London, 1977; 238-61

(31) HAIM, N.; OBEDANU, N.; MESHULAM, T.; ROBINSON, E.; SCHREIBER, H.; MERZBACH, D.: Neutrophil function in cured cancer patients. Cancer, 1977; 40: 2273-77

(32) HAIM, N.; OBEDANU, N.; MESHULAM, T.; ROBINSON, E.; MERZBACH, D.: Spontaneous and stimulated NBT-tests in patients with solid malignant tumors. J. Clin. Pathol., 1977;

(33) HIBBS, J. B.; LAMBERT, L. H. and REMINGTON, J. S.: Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity tumor killing. Nature, 1972; 235: 48-50

(34) HILL, H. R.; ESTENSEN, R. D.; QUIE, P. G.; HOGAN, N. A. and GOLDBERG, N. D.: Modulation of human neutrophil chemotactic responses by cyclic 3'5'-guanosine monophosphate and cyclic 3'5'-adenosine monophosphate. Metabolism, 1975; 24: 447-456

(35) ITOGA, T.; LASZLO, J.: Döhle bodies and other granulocytic alterations during chemotherapy with cyclophosphamide. Blood, 1962; 20: 668-74

(36) KELLER, H. U.; WILKINSON, P. C.; ABERCROMBIE, M.; BECKER, E. L.; HIRSCH, J. G.; MILLER, M. E.; RAMSEY, W. S.; ZIGMOND, S. H.: A proposal for the definition of terms related to Locomotion of leucocytes and other cells. Clin. Exp. Immunol., 1977; 27: 377-380

(37) LEHRER, R. J.; CLINE, M. J.: Leucocyte candidacidal activity and resistance to candidiasis in patients with cancer. Cancer, 1971; 27: 1211-17

(38) LOHRMANN, H. P.; SCHREML, W.: Early and late effects of adjuvant chemotherapy (Adriamycin/Cyclophosphamide) on the human granulopoesis in Hematology and Blood Transfusion. J. Blood Res., 1979; 24: 111-122

(39) MADERAZO, E. G.; WORONICK, C. L.: A modified Micropore Filter Assay of Human Granulocyte Leukotaxis. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 43-55

(40) MALPAS, J. S.; WHITEHOUSE, J. M. A.: Cytostatics and immunosuppressive drugs. In: DUKES, M. N. G.: Mylers Side effects of drugs, Annual 2, Excerpta Medica, Amsterdam, 1978; 362-372

(41) MAYR, C.; SENN, H. J.; GALLMEIER, W. M.; BRUNTSCH, U.; BECKER, R.; DRINGS, P.; FRITZE, D.; KAUFMANN, M.; QUEISSER, W.; KEMPGENS, U.: Adriamycin - Kombinationschemotherapie mit oder ohne Immunstimulation durch Corynebakterium parvum bei metastasierendem Mamma-Ca. Dtsch. Med. Wschr., 1979; 49: 1739-42

(42) McCUTCHEON, M.: Chemotaxis in leukocytes. Physiol. Rev., 1946; 26: 319-336

(43) McNAB, R. M.; KOSHLAND, D. E. jr.: Gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1972; 69: 2509-2512

(44) McRIPLEY, R. J.; SELVARAI, R. J.; GLOVSKY, M. M.; SBARRA, A. J.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions V. Phagocytic and bactericidal activities of leucocytes from patients with different neoplastic disorders. Cancer Res., 1967; 27:674-85

(45) MYERS, C. E.; McGUIRE, W. P.; LISS, P. H.; IFRIM, I.; GRAKINGER, K.; YOUNG, P. C.: Adriamycin. The role of lipid-peroxidation in cardiac toxity and tumor response. Science, 1977; 197: 165-167

(46) MYERS, C. E.: Antitumor antibiotics I. Anthracyclines. In: PINEDO, H. M.: Cancer chemotherapy. The EORTC Cancer chemotherapy annual 1; Excerpta medica, Amsterdam, 1979; 56-74

(47) NELSON, R. D.; QUIE, P. G. and SIMMONS, R. L.: Chemotaxis under agarose: A new and simple method for measuring chemotaxis and spontaneous migration of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. J. Immunol., 1975; 115: 1650-1656

(48) NELSON, R. D.; McCORMACK, R. T. and FIEGEL, V. D.: Chemotaxis of human leukocytes under Agarose. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods. Physiology and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 25-42

(49) NETH, R.; WINKLER, K.: Proteinsynthese in menschlichen Leukozyten: II. Wirkung einiger Antibiotika auf die Proteinsyntheseleistung von Zellsuspensionen und auf die Peptidyltransferase-Aktivität in zellfreien Systemen. Klin. Wschr., 1972; 60: 523-524

(50) O'FLAHERTY, H. T.; WARD, P. A.: Chemotactic Factors and the Neutrophil. Sem. Hematol., 1979; 16: 163-174

(51) QUIE, P. G.; CATES, K. L.: Clinical manifestations of Disorders of Neutrophil. Chemotaxis. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical implications. Raven Press, N. Y., 1978; 307-328

(52) SAGONE, A. L.; GURTON, G. M.: The effect of BCNU and Adriamycin on normal and G-6-P-D-deficient erythrocytes. Am. J. Hem., 1979; 7: 97-106

(53) SCHIFFMANN, E.; CORCORAN, B. A.; WAHL, S. M.: N-formyl-methionylpeptides as chemoattractants for leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975; 72: 1059-62

(54) SCHIFFMANN, E.; GALLIN, J. I.: Biochemistry of Phagocyte Chemotaxis. Curr. Top. Cell. Reg., 1979; 15: 203-261

(55) SIEGERT, R.; BRÜCKEL, K. U.; RIED, W.: Über reduzierende Eigenschaften des menschlichen Blutes. 2. Ges. Exp. Med., 1951; 117-626

(56) SNYDERMAN, R.; PIKE, M. C.: An inhibitor of macrophage chemotaxis produced by neoplasms. Science, 1976; 192: 370-372

(57) SNYDERMAN, R.; PIKE, M. C.: Pathophysiologic Aspects of Leukocyte Chemotaxis: Identification of a Specific Chemotactic Factor Binding Site on Human Granulocytes and Defects of Macrophage Function Associated with Neoplasia. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G., Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 357-378

(58) STEIGBIGEL, R. T.; LAMBERT, L. H.; REMINGTON, J. S.: Polymorphonuclear leucocyte, monocyte and macrophage bactericidal function in patients with Hodgkin's disease. J. Lab. Clin. Med., 1976; 88: 54-62

(59) STOSSEL, T. P.: The mechanism of Leucocyte Locomotion. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 143-160

(60) STRAUSS, R. R.; PAUL, B. B.; JACOBS, A. A.; SIMMONS, C.; SBARRA, A. J.: The metabolic and phagocytic activities of leucocytes from children with acute leucemia. Cancer Res., 1970; 30: 480-88

(61) STUART, N. J.; DE ALARCON, P. A.; BARESINCHAK, M. K.: Inhibition of Adriamycin-induced human platelet lipid peroxidation by Vit. E; Am. J. Hem., 1978; 5: 297-303

(62) TATTERSALL, M. H. N.: Anticancer Drugs: Mode of action and pharmacokinetics. In: HOFFBRAND, A. V.; BRAIN, M. C.; HIRSH, J.: Recent Advances in Hematology. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1977; 325-348

(63) WARD, P. A.; ANTON, T.; MADERAZO, E.: Defective leukotaxis in cancer patients. Clin. Res., 1976; 24: 463A

(64) WILKINSON, P. C.; ALLAN, R. B.: Assay System for Measuring Leukocyte Locomotion: An Overview. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 1-24

(65) WILLIAMS, L. T.; SNYDERMAN, R.; PIKE, M. C.; LEFKOWITZ, R. J.: Spezific rezeptor sites for chemotactic peptides on human polymorphonuclear leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1977; 74: 1204-8

(66) WILMS, K.; RÜCKLE, H.: Die zytostatische Chemotherapie des Mammakarzinoms. Krankenhausarzt, 1976; 49: Heft 8

(67) WILMS, K.; RÜCKLE, H.; LÖFFLER, B.: Richtlinien zur Behandlung des metastasierenden Mamma-Ca. Unveröffentlichtes Material der Universitätsklinik Tübingen, Protokoll 5/76

(68) ZIGMOND, S. H. and HIRSCH, J. G.: Effects of cytochalasin B on polymorphonuclear leukocyte locomotion, phagocytosis and glycolysis. Exp. Cell. Res., 1972; 73: 383-393

(69) ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G.: Leukocyte locomotion and chemotaxis - new methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. J. Exp. Med., 1973; 137: 387-410

(70) ZIGMOND, S. H.: Mechanisms of sensing chemical gradients by polymorphonuclear leukocytes. Nature, 1974; 249: 250-252

(71) ZIGMOND, S. H.: A modified millipore Filter Method for Assaying Polymorphonuclear Leukocyte Locomotion and chemotaxis. In: Antibiotics and Chemotherapy, Karger, Basel, 1974; Vol. 19: 126-145

(72) ZIGMOND, S. H.: Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in Gradients of chemotactic Factors. J. Cell. Biol., 1977; 75: 606-16

(73) ZIGMOND, S. H.: A new visual assay of leukocyte chemotaxis. In: GALLIN, J. I.; QUIE, P. G.: Leukocyte Chemotaxis: Methods, Physiology, and Clinical Implications. Raven Press, N. Y., 1978; 57-64

(74) ZIGMOND, S. H.: Chemotaxis by Polymorphonuclear Leukocytes. Review. J. Cell Biol., 1978; 77: 269-287

Lebenslauf

Ich, Markus Karutz, wurde am 14.4.57 als erstes von drei Kindern des Ingenieurs Matthias Karutz und der Lehrerin Doris Karutz, geb. Rellensmann, in Trossingen Kreis Tuttlingen geboren.

1959 siedelten meine Eltern nach Stuttgart um. Dort wurde ich 1964 in die Freie Waldorfschule am Kräherwald eingeschult. 1976 bestand ich dort das Abitur.

Zum Wintersemester 1976/77 begann ich mit dem Medizinstudium an der Universität Ulm.

Nach bestandenem Physikum wechselte ich zum Wintersemester 78/79 an die Universität Tübingen. Im Sommersemester 79 absolvierte ich den ersten Teil und im Wintersemester 81/82 den zweiten Teil der Ärztlichen Prüfung.

Das Praktische Jahr absolvierte ich in den Fächern Innere Medizin und Chirurgie an den Städt. Krankenanstalten Esslingen, im Wahlfach war ich an der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen. Am 18.4.83 bestand ich den dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Am 11. September 1982 heiratete ich die Medizinstudentin Renate Knapp.